

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-012290

(43)Date of publication of application : 19.01.1988

(51)Int.Cl.

C12P 7/64
//C12P 7/64
C12R 1:645)

(21)Application number : 61-212168

(71)Applicant : LION CORP

(22)Date of filing : 09.09.1986

(72)Inventor : TOTANI EISEI
SUNAZAKI KAZUHIKO
KUDO TOSHIHIRO

(30)Priority

Priority number : 60218558
61 73450Priority date : 01.10.1985
31.03.1986Priority country : JP
JP

(54) PRODUCTION OF LIPID CONTAINING ARACHIDONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a lipid rich in arachidonic acid useful as a precursor of prostaglandin, thromboxane, etc., by culturing a specific microbial strain belonging to *Mortierella* genus.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to *Mortierella* genus and selected from *Mortierella alpina*, *bainieri*, *elongata*, *exigua*, *minutissima*, *verticillata*, *hygrophila* and *polycephala* is cultured in a solid-liquid medium by standing culture, shaking culture, aeration and agitation culture, etc. The microbial cells are separated from the cultured product, disintegrated by mechanical or physical means and extracted with a solvent, supercritical carbon dioxide, etc., to obtain a lipid rich in arachidonic acid. The culture is preferably carried out at an initial pH of 4.0W7.0 at 10W33° C, especially 20W30° C for 2W20 days.

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑩ 公開特許公報 (A) 昭63-12290

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)1月19日

C 12 P 7/64
//C 12 P 7/64
C 12 R 1:645)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 アラキドン酸含有脂質の製造方法

⑮ 特 願 昭61-212168

⑯ 出 願 昭61(1986)9月9日

優先権主張 ⑰ 昭60(1985)10月1日 ⑱ 日本(J P) ⑲ 特願 昭60-218558

⑳ 昭61(1986)3月31日 ㉑ 日本(J P) ㉒ 特願 昭61-73450

⑳ 発 明 者 戸 谷 永 生 神奈川県小田原市中町3-1-12 コーポ明和102

㉑ 発 明 者 砂 崎 和 彦 神奈川県中郡二宮町富士見ヶ丘3-17-34号

㉒ 発 明 者 工 藤 俊 博 神奈川県秦野市南ヶ丘2-2-2-306号

㉓ 出 願 人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号

㉔ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外5名

明 細 書

1. 発明の名称 アラキドン酸含有脂質の製造方法

2. 特許請求の範囲

モルティエラ属のアルピナ、バイニエリ、エロンガタ、エクシグア、ミスティッシマ、ヴァーティシラタ、ハイグロフィラまたはポリセファラ種のいずれかに属する菌株を培養することによりアラキドン酸を含む脂質を生産すること特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はアラキドン酸含有脂質の製造方法に関し、更に詳細にはモルティエラ属に属する特定の菌株を培養して、アラキドン酸含量の高い脂質を製造する方法に関する。

(従来の技術)

アラキドン酸は、子宮筋収縮・弛緩作用、血管拡張、血圧降下作用等、強力かつ多彩な生理活性を有するプロスタグランディン、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆物質といわれ、近年特に注目されている。アラキドン酸は動物界に広く分布しており、従来、動物副腎腺や肝臓から抽出した脂質から分離されている。しかしこれらの脂質中のアラキドン酸含有量は一般に5%以下であり、乾燥細胞重量当りの収率は0.2%以下にすぎないこと、原材料の大量入手が困難であることなどから、この抽出法はアラキドン酸の有用な製造法とはいえない。

一方、アラキドン酸生産能を有する種々の微生物

物を培養してアラキドン酸を得る方法が提案されている。たとえば特開昭52-64482号公報、同52-64483号公報、同52-64484号公報には、ペニシリウム属、クラドスポリウム属、ムコール属、フザリウム属、ホルモデンドラム属、アスペルギルス属、またはロードトルラ属に属するアラキドン酸生産能を有する微生物を炭化水素、炭水化物等を炭素源とする培地で培養し、培養物からアラキドン酸を採取する方法が記載されている。しかしこの方法により得られる脂質中のアラキドン酸含有量は7.5%以下であり、乾燥固体当りの収率も1%に満たない。

また接合菌類はえかび目の糸状菌であるエントモフトラ属、デラフィロキシア属、コニディオボルス属、フィチウム属およびフィトフトラ属に属する菌にアラキドン酸を生産する菌があり、エントモフトラ属のE. エクシティアリスでは脂質中の全脂肪酸の27.1%、E. イグノリスでは19.1%、E. サクステリアナでは18.8%をアラキドン酸が占めていると報告されている〔D.

ティレル(D. Tyrrell)、カナディアン・ジャーナル・オブ・マイクrobiオロジー (Can. J. Microbiol.), Vol. 13 (1967)、755-760〕。さらにモルティエラ、レニスポラがアラキドン酸を生産すること、菌糸の脂質生産量は4.8%、脂質中のアラキドン酸含有量は26.7%であること(R. H. ハスキンス(Haskins) ら、Can. J. Microbiol., Vol. 10 (1964)、187-195)、および、紅黴類ボルフィリディウム・クルエンタムがアラキドン酸を生産すること、その収率は、乾燥細胞重量当り1%以下であること(T. J. アヘルン(Ahern) ら、バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング(Biotechnology and Bioengineering), Vol. XXV、1057-1070 (1983)) も、報告されている。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしこれら微生物の乾燥固体重量当りのアラキドン酸含量、および得られる脂質中のアラキドン酸含量はいずれも十分に高いものとはいえない

った。したがって本発明の目的は、乾燥固体重量当りのアラキドン酸含量、およびこの固体から抽出される脂質中のアラキドン酸含量が高く、アラキドン酸の分離精製が容易で、高純度のアラキドン酸を高収率で得ることができる方法を提供することである。

(問題を解決するための手段)

本発明者は、モルティエラ属に属する菌種についてそのアラキドン酸生産能を研究したところ、特定の菌種の微生物がアラキドン酸含量の高い脂質を生産することを見出し本発明を完成するに至った。

本発明は、モルティエラ(*Mortierella*) 属のモルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)、モルティエラ・バイニエリ(*Mortierella bainieri*)、モルティエラ・エロンガタ(*Mortierella elongata*)、モルティエラ・エクシグア(*Mortierella exigua*)、モルティエラ・ミヌティッシマ(*Mortierella minutissima*)、モルティエラ・ヴァーティシ

ラタ(*Mortierella verticillata*)、モルティエラ・ハイドロフィラ(*Mortierella hygrophila*)、またはモルティエラ・ポリセファラ(*Mortierella polycephala*) 種のいずれかに属する菌株を培養することによりアラキドン酸を含む脂質を生産することの特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法である。

本発明に有利に使用される菌の具体例としては、モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*) IFO 8568、ATCC 16286、ATCC 32221、ATCC 42430

モルティエラ・バイニエリ(*Mortierella bainieri*) IFO 8569

モルティエラ・エロンガタ(*Mortierella elongata*) IFO 8570

モルティエラ・エクシグア(*Mortierella exigua*) IFO 8571

モルティエラ・ミヌティッシマ(*Mortierella minutissima*) IFO 8573

モルティエラ・ヴァーティシラタ(*Mortierella*

verticillata) IF0 8575
 モルチエセラ・ハイグロフィラ(Mortierella
 hygrophila) IF0 5941
 モルチエセラ・ポリセファラ(Mortierella
 polycephala) IF0 6335
 等があげられる。これらの菌は大阪市の財団法人
 菌類研究所(IFO)及び米国アメリカン・タイ
 プ・カルチャー・コレクション(American Type
 Culture Collection, ATCC)の菌株目録に記載さ
 れている糸状菌である。

上記の糸状菌の培養は菌液の増地を用いて、静
 置培養、振盪培養、通気振盪培養などにより行わ
 れる。好ましい増地としては、ジャガイモ、サト
 イモ、サツマイモ、キャッサバ、タロイモ、キウ
 イモなどのイモ浸出液、麦芽エキス、ペプトン、
 酵母エキス、コーン・スティープ・リカー、ガゼ
 ーノ酸などに炭水化物物を加えまたは加えずに
 調製した増地、とくに好ましくは、ジャガイモ浸
 出液と炭水化物の混合物あるいは麦芽エキスがあ
 げられる。

案、その他の栄養源を添加して用いることもでき
 る。

培養の初発 pH は、4.0~7.0 が適当であり、
 培養温度は、10~33℃で好ましくは、20~
 30℃で2~20日間培養される。

このような好気条件下での培養により当該糸状菌
 は培養され、生産される脂質は、大方、菌体内に
 含まれるので培養物より菌体を分離し、機械的ま
 たは物理的に摩擦後、溶剤、超臨界二酸化炭素な
 どにより抽出し、アラキドン酸含有量の高い脂質
 を得る。

得られた脂質は常法の加水分解、エステル化、
 またはエステル交換後、アラキドン酸の含有率を
 評価できる。また、脂質中のアラキドン酸含量が
 高いために従来法に比較して段階的に容易かつ経
 済的に溶剤やクロマトグラフィー分離、尿素付加
 分離法等により目的のアラキドン酸あるいはアラ
 キドン酸エステルの精製を行うことができる。アラ
 キドン酸あるいはアラキドン酸エステルの収率は、
 乾燥菌体当たり、最高28.7%であり、従来の

イモ浸出液を調整するには、約1cm角に切った
 イモを1ℓの水に300gから2000g、好まし
 くは、400gから1000gを加えて約20分
 煮沸後、布で濾し、蒸留水を用いて1ℓの浸出液
 を作る。炭水化物は0~20%好ましくは、2~
 10%、浸出液の滅菌前あるいは別途滅菌したも
 のを浸出液滅菌後に添加する。炭水化物としては
 例えばグルコース、フラクトース、サッカロース、
 糖蜜、木材糖化液、デンプン水解物などがあげら
 れる。微量添加成分として、2価の金属、例えば
 Ca^{++} あるいは Mg^{++} があげられる。 Ca^{++} の添
 加量は0.02~2g/ℓ(ℓ又はkg増地)、好まし
 くは、0.05~1g/ℓ(ℓ又はkg増地)がよく、
 Mg^{++} の添加量は0.01~5g/ℓ(ℓ又はkg増地)、
 好ましくは、0.02~2g/ℓ(ℓ又はkg増地)が
 よい。

窒素源としてアンモニア、アンモニウム塩、グ
 ルタミン酸、アスパラギン酸、尿素などを適宜組
 合せ、これに必要に応じてカリウム、ナトリウム、
 鉄、亜鉛、銅、マンガンなどの無機塩と、微量要

約20~30倍の生産性を実現できることになる。

〔発明の効果〕

本発明によれば、アラキドン酸含有量の高い脂
 質を得ることができ、従来法の約30倍の収率で
 アラキドン酸を生産することができる。このよう
 に脂質中のアラキドン酸含量が極めて高いので、
 アラキドン酸の精製を非常に容易かつ短時間に行
 うことができ、高純度のアラキドン酸を大量かつ
 安価に供給することができる。したがってこれを
 原料として、種々の薬理活性が利用かつ期待され
 ているプロスタグランディン、トロンボキサン、
 プロスタサイクリン、ロイコトリエン等を従来よ
 り安価に合成することができる。

〔実施例〕

以下実施例により本発明を更に具体的に説明す
 る。

実施例1

200gのジャガイモからの浸出液とグルコース
 20gに蒸留水を加えて1000mlとした培
 養液を pH 5.6 に調整した。その200mlを

500 ml の坂口フラスコに入れた培地にモルティエラ・アルビナ (IFO 8568)、モルティエラ・エロンガタ (IFO 8570) を個別に白金耳量接種し、25℃で6日間振盪培養した。得られた菌体は直ちに6000 rpm で遠心分離して凍固し、濾紙でできるかぎり水分をとり除いたのち秤量した。ついでその一部は、乾燥重量を求めるために用い、また残りは、乳体内でクロロホルム/メタノール (2:1 V/V) と共にすりつぶし、引き続きクロロホルム/メタノール (2:1 V/V) で脂質を抽出した。得られた脂質は、ナトリウムメトキไซด์を用いてメチルエステル化後、その脂肪酸組成をクロマトグラフ分析してアラキドン酸の含有率を求めた。結果を表1に示す。

表 1

菌	乾燥菌体重量 (g/ℓ)	抽出された脂質の重量 (g/ℓ)	抽出された脂質中のアラキドン酸の含有率 (%)	抽出された脂質中のアラキドン酸の含有率 (%)
モルティエラ・アルビナ IFO 8568	6.14	2.56	3.69	10.9
モルティエラ・エロンガタ IFO 8570	8.02	3.84	1.8	6.2

ハスキンスらは、前述のごとくモルティエラ・レニシボラから乾燥菌体重量当り4.8%の脂質を得、その脂質中のアラキドン酸含量が2.67%であったことを報告しているが、これを乾燥菌体重量当りのアラキドン酸含量に換算すると1.28% (=2.67%×4.8%) になる。これに対して本発明によると、それに対応する表1中の数値は、アルビナは10.9%、エロンガタは6.2%であり、それぞれハスキンス法の約8倍と5倍を示し、本発明の生産効率が優れていることがわかる。

表2例2

400 g のジャガイモからの浸出液にグルコース40 g と寒天40 g を加え蒸留水で2000 ml とした培養液 (pH 5.6) をオートクレーブにかけ直径80 mm の滅菌シャーレ100個に分注して寒天培地を調整した。50個ずつのシャーレにモルティエラ・アルビナ (IFO 8568) とモルティエラ・エロンガタ (IFO 8570) を個別に白金耳量接種し、25℃で10日間培養した。培養後、培地上の白綿状の菌糸をスパチュ

ラで黒め、実施例1と同様の処理を行って表2の結果を得た。

上記の2株と同様にモルティエラ・アルビナ (ATCC 16266、ATCC 32221、ATCC 42430)、モルティエラ・バイニエリ (IFO 8569)、モルティエラ・エクシグア (IFO 8571)、モルティエラ・ミスティシマ (IFO 8573)、モルティエラ・ヴァーティシラタ (IFO 8575)、モルティエラ・ハイグロフィラ (IFO 5941)、モルティエラ・ボリセファラ (IFO 6335) についても培養を行い、その抽出脂質から得たメチルエステルの分析結果を表2にあわせて示す。

表 2

菌	乾燥固体重量当りの メチルエステル量(X)	メチルエステル中のア ラキドン酸含有率(Z)	乾燥固体重量当りのアラキ ドン酸メチル含有率(Y)	生産効率(対ハスキンス法) 生産効率(対従来生産法)
モルティエラ・アルビナ IFO 8568	35.8	80.2	28.7	2.2倍 2.9%
モルティエラ・アルビナ ATCC 16266	37.0	64.8	24.0	1.9% 2.4%
モルティエラ・アルビナ ATCC 32221	34.7	70.6	24.5	1.9% 2.5%
モルティエラ・アルビナ ATCC 42430	27.9	80.1	22.3	1.7% 2.2%
モルティエラ・バイニエリ IFO 8569	38.6	23.0	10.8	8% 1.1%
モルティエラ・エロンガタ IFO 8570	46.2	35.7	16.5	1.3% 1.7%
モルティエラ・エタシダ IFO 8571	14.3	37.6	5.4	4% 5%
モルティエラ・ミスティッシュ IFO 8573	33.6	45.4	15.3	1.2% 1.5%
モルティエラ・ヴァーティシラタ IFO 8575	33.0	42.3	14.0	1.1% 1.4%
モルティエラ・ハイダロフィラ IFO 5941	21.5	36.3	6.5	5% 7%
モルティエラ・ポリキファタ IFO 6335	14.5	47.2	6.8	5% 7%

乾燥固体重量当りのアラキドン酸メチルの含有率は、ハスキンス法(1.28%)と比較して特にアルビナは2.2倍、他の従来生産法と比較すると2.9倍となり、著しい生産効率の向上が期待できる。

実施例3

日水製薬社製寒天培地45gを蒸留水1000mlに加えオートクレーブで121℃15分間滅菌後、直径80mmの滅菌シャーレ50個に分注して寒天培地を調整した。10個ずつのシャーレにモルティエラ・アルビナ(IFO 8568)、モルティエラ・バイニエリ(IFO 8569)、モルティエラ・エロンガタ(IFO 8570)、モルティエラ・ミスティッシュ(IFO 8573)、モルティエラ・ヴァーティシラタ(IFO 8575)、を個々に白金耳直接接種し、25℃で10日間培養した。培養後、培地上的白色の固体をスバチュラで集め、実施例1と同様の処理を行って表3の結果を得た。

上記の5株と同様にモルティエラ・アルビナ

ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430についても培養を行い、その抽出脂質から得たメチルエステルの分析結果を表3にあわせて示す。

菌	乾燥菌体中の ガラキド・脂肪酸の 含有率 (%)	ガラキド・脂肪酸の 含有率 (%)	乾燥菌体中の ガラキド・脂肪酸の 含有率 (%)
モルチエラ・アルビナ IFO 8568	33.7	78.8	26.6
モルチエラ・アルビナ ATCC 16866	32.4	68.5	22.2
モルチエラ・アルビナ ATCC 32821	37.5	70.3	26.4
モルチエラ・アルビナ ATCC 42430	36.5	70.1	25.6
モルチエラ・アルビナ IFO 8569	29.5	26.4	7.8
モルチエラ・ロガシタ IFO 8570	24.8	30.0	7.4
モルチエラ・ロガシタ IFO 8571	15.4	53.0	8.2
モルチエラ・ロガシタ IFO 8572	14.0	50.9	7.1

菌	乾燥菌体中の ガラキド・脂肪酸の 含有率 (%)	乾燥菌体中の ガラキド・脂肪酸の 含有率 (%)
モルチエラ・アルビナ ATCC 42430	23.3	65.1
		18.2

特開昭63-12290(6)

実施例 4

日水製薬社製サブロー寒天培地32.5gを蒸留水500mlに加え、オートクレーブで121℃、15分間滅菌後、直径80mmの滅菌シャーレ25個に分注して寒天培地を調整した。この培地にモルチエラ・アルビナATCC 42430を白金耳量接種し、25℃で10日間培養した。培養後、培地上的白色の菌糸をスベチウラで集め、実施例1と同様の処理を行って表4の結果を得た。

実施例 5

ジャガイモ100g、300g、500gからの浸出液のそれぞれにグルコース30gと蒸留水を加え、各500mlとした培養液を500mlずつ分注滅菌後、モルチエラ・アルビナ(IFO 8568)を接種し、25℃下、20日間振盪培養した。得られた菌体は遠心分離により菌体洗浄後、乾燥し、乳鉢内でクロロホルム/メタノール(2:1 V/V)と共にすりつぶし、引き続きクロロホルム/メタノール(2:1 V/V)で総脂質を抽出した。得られた脂質は、ナトリウムメトキサイドを用いてメチルエステル化後、その脂肪酸組成をクロマトグラフ分析してアラキドン酸の含有率を求め、表5の結果を得た。

ジャガイモの使用量が多くなるにしたがってアラキドン酸の収率も向上することがわかる。

表 5

試 料	抽出液量 (g/株)	抽出液濃度 (%)	抽出液量 (g/株)	抽出液濃度 (%)	抽出液量 (g/株)	抽出液濃度 (%)	抽出液量 (g/株)	抽出液濃度 (%)
ジャガイモ 200g/株	6.46	36.5	42.3	15.4	0.998			
IFO 8568	14.8	29.0	39.7	11.5	1.70			
ジャガイモ 1000g/株	10.0	30.9	32.8	11.7	2.11			

実施例 6

ジャガイモ600gからの抽出液にグルコース60gを加え、蒸留水で1ℓとした培養液を4本のL字管に250mℓずつ分注滅菌した。同時に、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 185mg、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100mg及び515mgをそれぞれ1mℓの水に溶かしたものを添出し、個々に3本のL字管に加えた後、モルチエラ・アルビナ(IFO8568)を接種し、25℃下20日間振盪培養した。得られた菌体は遠心分離により菌体洗浄後、乾燥し、実施例5と同様の処理を行って表6の結果を得た。

表 6

試 料	抽出液量 (g/株)	抽出液濃度 (%)	抽出液量 (g/株)	抽出液濃度 (%)	抽出液量 (g/株)	抽出液濃度 (%)	抽出液量 (g/株)	抽出液濃度 (%)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 185mg/250mℓ	15.8	21.7	42.7	11.8	1.99	17.1		
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100mg/250mℓ	18.2	26.9	40.7	10.9	1.99	17.1		
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 515mg/250mℓ	13.7	36.3	35.5	12.9	1.77	4.1		
なし	14.8	29.0	39.7	11.5	1.70	0		

Ca^{++} と Mg^{++} は明らかに増地当りのアラキドン酸メチルの収率を向上させるが、乾燥菌体重量当りのアラキドン酸メチルの含有率はほぼ一定であった。

アラキドン酸精取のため、モルチエラ・アルビナの総脂質をエステル化して得られたメチルエステル50mgを逆相系薄層板RP-18F(メルク社製)上でメタノール/アセトニトリル(1:1 V/V)を用いて展開し、Rf値0.41のバンドをかきとって回収したところ、純度95.9%(4.1%はγ-リノレン酸メチル)のアラキドン酸メチルが35mg得られた。

<アラキドン酸メチルの同定>

本発明により得られたモルチエラ菌の菌体より単離したアラキドン酸メチル(メチルエイコサ-5, 8, 11, 14-テトラエノイト 分子量318.5)は以下の5項目の分析により同定を行った。

i) 元素分析: 純度95.9%のアラキドン酸メチル(4.1%はγ-リノレン酸メチル)の分析

結果は、炭素が79.34%、水素が11.21%であった。計算値はそれぞれ79.15%と10.77%であり、よい一致をみた。

ii) ガスクロマトグラフ分析: DEGS 15% (カラム温度190℃)、SE-30 (カラム温度170℃)、OV-101 (カラム温度170℃)の3種のカラムを用いて標準のアラキドン酸メチルの保持時間と比較したところ、非常によく一致した。

iii) ガス・マス分析: DEGS 10% (カラム温度200℃)を通過させ、該当するピークをイオン化電圧70 eVでイオン化して得たマスフラグメントパターンを標準のアラキドン酸メチルのマスフラグメントパターンと比較したところ、両者は類似しており、親ピークは318に現れた。但し、 m/e 200以上のフラグメントシグナルは、 m/e 0-200の範囲の感度の5倍にして測定した。

iv) H-核磁気共鳴スペクトル分析: 標準のアラキドン酸メチルのスペクトルと類似し、 δ 値

3.6 ppm 付近のメチルエステルのプロトン強度を基準として計算すると二重結合核に直接結合するプロトン (5.0~5.7 ppm) は8個、二重結合にはさまれたメチレンのプロトン (2.6~3.3 ppm) は6個存在することがわかり、メチルテトラエノエイトの構造を支持した。

v) C^{13} -核磁気共鳴スペクトル分析: δ 値15~35 ppmのメチレンの炭素に由来するシグナル、50 ppm 付近のメチルエステルの炭素に由来するシグナル、130 ppm 付近の二重結合核を形成する炭素によるシグナルの各々のパターンが標準アラキドン酸メチルのそれと類似し、当該物質がアラキドン酸メチルの二重結合に関する位置異性体でないことを確認した。